

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-119500

⑬ Int. Cl.

⑭ 特許庁

⑮ 庁内整理番号

⑯ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C※等価請求 未請求 発明の図 5 (全13頁)

⑰ 発明の名称 炭酸水多量体DS 4152並びにこれを含む血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑱ 特 願 昭62-125443

⑲ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑳ 優先主張 ㉑ 昭61(1986)5月23日 ㉒ 日本(JP) ㉓ 特願 昭61-118847

㉔ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉕ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉖ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉗ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

㉘ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

グラフト重合体)

1. 発明の名称

蛋白質含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

炭酸水多量体DS 4152 並びにこれを含む

リン法、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

重合体)

2. 特許請求の範囲

(4) 比較例

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

(a) $T_g -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

を有する炭酸水多量体DS 4152。

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収有

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

28000 ± 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

メタノール、エタノール等の有機溶媒

N 0.51~0.59% S 1.06~1.17%

には殆ど不溶。

P 0.77~1.06%

(7) 着色反応

(3) 重合および蛋白質の含量

フェノール-炭酸、アンスロン-炭酸、ビ

蛋白質含量(%) : 97 ± 3 (フェノール-炭酸法、

エレフト反応およびローリー・フェリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の區別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(9) 構成成分および炭素量、窒素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 $2O_2N$

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソロシン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

水の電導第5項記載の血管新生抑制剤。

2 炭酸化多環体D8 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新成分炭酸化多環体D8 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、イタロコプカス19:AT-28の発癌生動物中に腫瘍誘導作用、癌増進作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多環体D8 4639が存在することが知られて

2 炭酸化多環体D8 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多環体D8 4152を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5 炭酸化多環体D8 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6 ステロイドが糖質コルチチド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第7項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多環体D8 4639について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねた結果、D8 4639が強い発癌性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねたついでとて、D8 4639は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのD8 4152と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、この03 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規な免疫化多糖体03 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体03 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体03 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本発明中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、実体形成、転移の他癌等に極めて重要なだけでなく、淋病リウマチを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が亢進する諸疾患、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体03 4152は、アルスロバクター 99.A7-25 (工業技術院微生物工

物工業技術研究所には、Microcococcus sp. A7-25として、FERM P-5255及びArthrobacter sp. A7-25としてFERM BP-1357の番号で寄託されている)の培養物から分離されるDP 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量の 1.5×10^4 以上の免疫性物質等を選別分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDP 4639を選別するゲルろ過媒体、例えば、セファクリル(Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高濃ゲルろ過クロマトグラフイ

ー(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(8面分)とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量の $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(1面分)を各々集め、透析する。

また、限外ろ過は通常の膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillipore社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特許YM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリスメリック(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5kg/cm²程度)し、透過液を03 4152として集めればよい。使用溶媒は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

C 34.42~35.76% E 33.4~39.8%

H 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(2) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%) : 5.7 ± 3 (フェノール-硫酸

法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

リン法、牛血清アルブミン

標準)

(4) 比旋光度

$(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロ

ホルム(10:2~3)または水が適当であ
り、4で乃差重量で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を最終後ろ通し、ろ液
を数倍量のエタノール中に沈降下注すること
により生成する白色沈澱を集め、90%エタノ
ール、エタノール、アセトンの順に洗った後、
減圧乾燥すれば、目的とする0.84152(1
面分)と発熱性物質(2面分)が各々得られ
る。

こうして得られる0.84152は以下に述べ
る物化学的諸性質を示す。下記の物性はそ
のナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

22000 ± 3000

(2) 元素分析値(S=フットの巾を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒
には殆ど不溶。

(7) 呈色反応

フェノール-硫酸、アンスロ-硫酸、ピ
ムレット反応およびローリー・フォリン反応
は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応
およびユンヒドリン反応も陽性。カルベソール
反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30,Na

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコ
ースを10としてそれぞれ約10:61:73
:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ酸

加水分解物のアミノ酸分析計による分析
で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シ
アミノピコリン酸、グルコサミン酸およびム
ン酸の存在を認める。

以上の0.84152は、後記実施例で示す如
く、単独でも血管新生抑制作用を有するもの
であるが、ステロイド剤と組合せることによ
り、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、
0.84152の代りにヘパリン、低分子ヘパリ
ン等を使用することもできる。

従来、アレフェゾロン、6-メチルアレ
フェゾロン、デキサメタゾン等のステロイド
ホルモンが、局所投与、点注、点注、点注

一般に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308 (1979) J. Hall,

Cancer Lett. 57 769 (1976) 及び Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、ベタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Oncology 10 72 (1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート、フオスフエート、ブチルアセチート、ナトリウムヘキサフルオレート、トリメチルアセチート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート等)；ベタメタゾンおよびその誘導体(フオスフエート、ヘキサチネート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水素が置換された異性体(たとえば、11 α -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトリウム塩(グルココルチコイド塩の有機は置換しきい)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の 4152 と置き換えることのできるステロイド類は、雄質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

- (1) プレグナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコーチゾンおよびその誘導体(アセチート、エナンチート、ワンダシレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

イドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセチート等)；ディプロゲステロンおよびその17 α -アセチキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メナロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセチート、トリメチルアセチート、エナンチート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

- (2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンチート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

特開昭63-119500 (B)

その誘導体、イピナオスタンがあげられる。
さらにフルオキシノステロンおよびその誘導体、ノタルテストロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(1) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、性腺ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストリオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の用途としては、有効成分を医学的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の塩酸用剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の03-4152はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、03-4152単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として有

用、錠剤、注射剤、液剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が03-4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、針管内、お尻内、経口、皮下、直腸内、結膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、03-4152として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン用、副腎コルチコイド用で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン用では100~1200mgが適量

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られた03-4639(50%)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム(セファクリルS-300; 50×80cm)にかけて同濃度にて層出し、18mlずつ層出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル濾過クロマトグラフィー(東洋ソーゲル 03000 SWカラム、層液0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5)を行い、ディフ・ディュームにピークを与えず、

特開昭63-119500(7)

分子量(デkastラン標準)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に属するフラクションを調り(約700ml)、脱イオン水に対して透析した。透析液を約50mlで交換して通じた。ろ液を約400mlのエタノール中へ投下して、生成した沈澱を調り、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃、6時間)して目的物のDS 4152の白色粉末3.6gを得た。

一方、上記高濃ゲル透過クロマトグラフィーでダイド・ポリニウムにピークを与えるフラクションを調り(約90ml)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、E成分を白色粉末として0.18gを得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭水素および糖の組成モル比

試体を1規定炭酸中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、炭水素および糖のモル比は、SおよびPの含量(%)から算出した。

第2表

	ガラクトース	グルコース	炭水素	糖
DS 4152	61	10	73	Q6
DP 4639	62	10	73	Q6
E成分	62	10	69	Q6

第2表は、グルコースを10モルとした場

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDP 4639およびそのE成分と比較して示す。

(c) 糖、蛋白、SおよびP含量(第1表)

第1表

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	56	1.11	1.1	Q88
DP 4639	54	1.08	1.3	Q86
E成分	42	7.9	7.6	Q72

1) フェノール-炭酸法(ガラクトース換算)

2) アントノビラスの方法(C.A. Antonopoulos, *Acta Chem. Scand.* 16, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S. Chen et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956))による。

各成分のモル比の1例である。

(d) 糖アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152を3規定炭酸中、100℃で16時間加水分解した後、常法によりアミノ糖分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアルイノシリン酸、グルコサミンおよびムラミン等のピークを認めた。

(e) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ ($c=0.5$, 水)

第3表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
E成分	-34

(f) ゲルろ過層出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

特開463-119500 (B)

あると規定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

DS 4152、DP 4639 およびH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(夏津ソーダ0.3000 g/gカラム使用、濃度0.1 M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 紫外線吸収スペクトル

2 mg/ml水溶液において220~340 nmに最大吸収は認められない。

(ii) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840 (nm) および810 cm^{-1} KBr錠に酸化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フォスファートを介してメチルアフリカン部の結合した硫酸化多糖体

第4表

試料	用量 mg/1.0ml	体積上昇値					
		合計	+	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45		
DP 4639	375	0.20	0.60	0.20	0.90		
H部分	15	1.65	1.25	1.40	4.30		
	75	1.40	2.00	1.80	5.20		
	15	1.90	1.40	2.20	5.50		
	75	1.60	1.75	2.65	6.20		

・+ (補注)。(補注)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であった。

実施例1 (ii)

DP 4639 (2.0 g) を300 mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(418 cm^2 、アicon社製)を用いて、真空で加圧(1.5 kg/cm²)下、重塩化銀外層を通した。上記溶液を通加しながら透過液量が約3 Lとなるまで実施した。透過液の濃度(約50 mg/ml)に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ投下し、生成した沈殿を乾燥、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(65℃、5時間)してDS 4152

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を除き、実測例1(4)の
DS 4152と同一であつた。

糖含量 56%

S含量 11.3%

蛋白含量 0.9%

P含量 0.92%

高速ゲルろ過クロマトグラムを第4図に示す
(0.3000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)、0.8M/分)。

実測例2

局所収縮血管新生阻止試験(直接法)：

局所を用い、タイラーとフォーマン

(Meltro 297:307,(1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、助成コルチゾン
を0.5mg/局所の量(血管新生に影響のない量)を用いた。また、比較として、DP 4639
及びE成分についてもその活性を調べた。こ
の結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E成分
ID ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実測例4

実測例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152の併用によるID₅₀値の変化を検
討した。この結果、図4のステロイドに10

特開63-119500(9)

部改良した以下の方法で行つた。

局(ノーランクロス)の4~6日酔受持用
の収縮剤に、生理食塩水で溶解したり3 4152
又はヘパリンを加し、37℃で培養した。

培養後2日後に、収縮剤血管の発達度を
生理食塩水のみを加した対照と比較し、ア
ロピット法により、50%血管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152のID₅₀値
は、100μgであつた。これに対し、ヘパ
リンは、100μgでも作用を示さなかつた。

実測例3

局所収縮血管新生阻止試験(直接法)：

実測例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152を加えれば、それぞれの局
所収縮血管新生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(mg/局所)	
	単独	DS 4152(増加 と併用)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
メチルプレドニゾン	060	005 (180)
テトラハイドロ	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
17β-エストラジオール	196	028 (70)
フルオキシメチステロン	124	012 (103)
5α-アンドロステロン	232	029 (8)

特開463-119500 (10)

この結果から明らかに、用量依存性的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (ss-via法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は30mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較と CDF 4639 及びE 画分を用いた。この結果を第8表に示す。また、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した後、末梢血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (ss-via法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%ノエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受胎期母鼠腹膜に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-5.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	37.8
	300	66.1

第8表

投与ルート	DS 4152	DF 4639	E 画分
皮下	92.2%	83.3%	86.8%
経口	92.7%	86.8%	82.8%

DS 4152 と並び DF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても末梢血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (ss-via法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または腹腔内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%ノエン

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期母鼠腹膜に加え、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスに、6時間経過後の血液を加えた場合の末梢血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

実施例8

試験方法：

CS71L/6雄マウスに同系の雌鼠を交配水産量45076を1×10°濃度下投与し、5日目よりDS 4152を30mg/4日1回6回投与したところ、著名な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように移植218日の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制)であり、かつノディアン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍長の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法：

ICR系統マウス(8週齢)にインコーマ180(8180)を1×10°濃度下投与し、3日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を250mg/4/80割合で3日間、100mg/4/80割合で1日投与した。DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/マウスとなる1日1回皮下もしくは経口に4日間投与した。移植7日に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第11日に示す如く酢酸コナソンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらにDS 4152を投与することにより腫瘍増殖阻止作用が得ら

表10

物質名(ルート)	投与量(mg/4)	DS 4152投与量(mg/4; p.o.)		腫瘍増殖阻止率(%)
		0	30	
コナソン酢酸塩(p.o.)	0	0	30	77
ナトリウムDS(p.o.)	1	0	30	75.1
	0	0	30	-26
エピナステロール(1.p.)	0	0	30	71.7
	0	0	30	-123
エピナステロール(1.p.)	0	0	30	80.7
	0	0	30	40
100	0	0	30	82
	0	0	30	184
100	0	0	30	234
	0	0	30	242
100	0	0	30	276

表10A

腫瘍系	群	投与量(mg/4)	腫瘍重量(mg/4; p.o.)	腫瘍増殖阻止率(%)
M8076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	DS 4152投与群	30	150±0.08 (37)	33

(a)移植218日の平均腫瘍重量±標準偏差、(b)平均腫瘍重量。

(c) (a) 腫瘍重量のノディアン生存日数/対照群のノディアン生存日数-1) × 100

れ、貯蔵時の減量率の0.9～1.25%であつた。

表 11 例

処 理	減 量 率	
	平均値±標準偏差	T/C%
生体食塩水 (p)	Q361± Q191	1000
生体食塩水 (p)	Q361± Q123	1000
酢酸コージン	Q340± Q162	942
0.5 4152 (Q61mg/..... p)	Q361± Q070	1000
0.5 4152 (Q1mg/..... p)	Q261± Q077	723
0.5 4152 (Q61mg/..... p) +酢酸コージン	Q063± Q016	175*
0.5 4152 (Q1mg/..... p) +酢酸コージン	Q026± Q011	74*
0.5 4152 (Q61mg/..... p)	Q322± Q071	824
0.5 4152 (Q1mg/..... p)	Q358± Q115	908
0.5 4152 (Q61mg/..... p) +酢酸コージン	Q063± Q036	161**
0.5 4152 (Q1mg/..... p) +酢酸コージン	Q036± Q016	49**

* P<0.05, ** P<0.01 スタートメントによる

減量し注射剤とする。

実施例 12

投与:

0.5 4152 6mg, プレフェゾン20mg, 乳糖50mg, トウモロコシデンプン135mg, カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg, ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図ないし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以上

特開 3-119500 (12)

実施例 10

製剤:

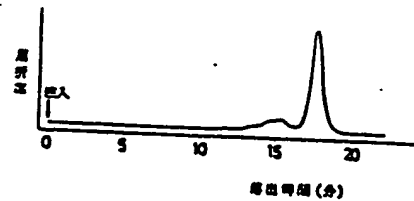
0.5 4152 6mg, 乳糖300mg, トウモロコシデンプン144mg, カルボキシメチルセルロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース20mgを用い、常法に従つて500mgの製剤を調製した。この製剤は錠状に成形して18500mg～5mgを服用する。

実施例 11

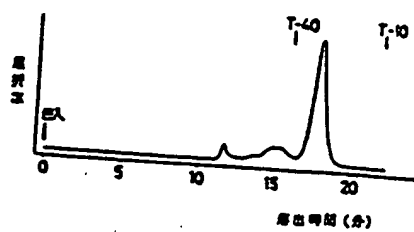
注射剤:

0.5 4152 12mg, 塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をノンアランフィルムでろ過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

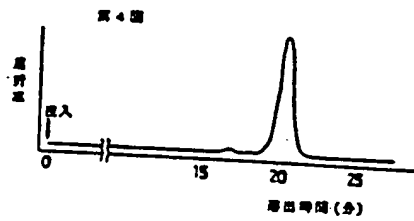
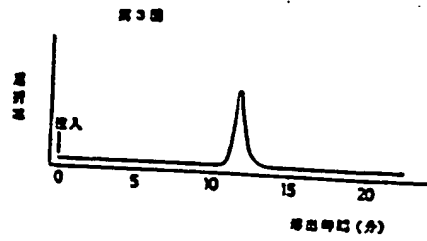
第 1 図



第 2 図



資料 63-119500 (13)



第1頁の続き

④Int. Cl.°

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
I(A 61 K 31/725
31:58)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

④発 明 者 小 河

秀 正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内